

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

09.11.99

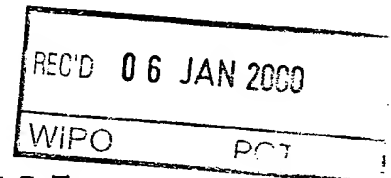
4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application:

1998年 9月30日



出 願 番 号  
Application Number:

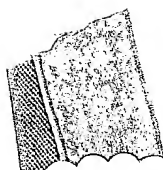
平成10年特許願第294675号

出 願 人  
Applicant(s):

天野製薬株式会社

PRIORITY  
DOCUMENT

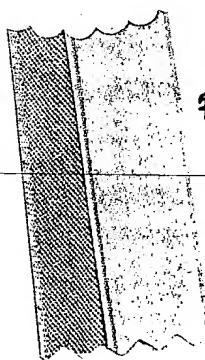
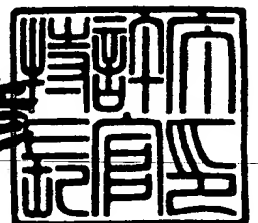
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



1999年12月10日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3085283

【書類名】 特許願

【整理番号】 P98-610

【提出日】 平成10年 9月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明の名称】 新規な酵素組成物、その製造法及び用途

【請求項の数】 14

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋敷 5 1 天野  
製薬株式会社 中央研究所内

    【氏名】 山本 繁

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県西春日井郡西春町大字九之坪西城屋敷 5 1 天野  
製薬株式会社 中央研究所内

    【氏名】 岡田 正通

【発明者】

    【住所又は居所】 静岡県静岡市小鹿 1 7 3 9 - 7

    【氏名】 碓氷 泰市

【発明者】

    【住所又は居所】 京都府宇治市五ヶ庄 京都大学職員宿舍 1 3 5

    【氏名】 坂田 完三

【特許出願人】

---

    【識別番号】 000216162

    【郵便番号】 460

    【住所又は居所】 愛知県名古屋市中区錦一丁目 2 番 7 号

    【氏名又は名称】 天野製薬株式会社

    【代表者】 天野 源之

    【電話番号】 0568(21)1411

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

【物件名】            要約書    1

【書類名】明細書

【発明の名称】新規な酵素組成物、その製造法及び用途

【特許請求の範囲】

【請求項 1】二糖配糖体に作用して、当該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する作用を有する酵素を有効成分として含有してなる新規な酵素組成物。

【請求項 2】二糖配糖体が  $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体である、請求項 1 記載の新規な酵素組成物。

【請求項 3】組成物が微生物より得ることができる請求項 1 又は請求項 2 記載の新規な酵素組成物。

【請求項 4】微生物を栄養培地中で培養し、培養物中に二糖配糖体に作用して、当該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する作用を有する酵素を生産蓄積せしめ、該酵素を含有する酵素組成物を製造することを特徴とする新規な酵素組成物の製造。

【請求項 5】栄養培地が、二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する作用を有する酵素の生産を誘導する物質を含有することを特徴とする請求項 4 記載の新規な酵素組成物の製造。

【請求項 6】誘導する物質が糖類である請求項 5 記載の新規な酵素組成物の製造。

【請求項 7】二糖配糖体が  $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体である、請求項 4 乃至請求項 6 記載の新規な酵素組成物の製造。

【請求項 8】微生物がアスペルギルス (*Aspergillus*) 属に属する微生物である請求項 4 乃至請求項 7 記載の新規な酵素組成物の製造。

【請求項 9】二糖配糖体を含有する材料に、当該二糖配糖体より二糖単位で糖を遊離する作用を有する酵素を有効成分として含有してなる新規な酵素組成物を作用せしめることを特徴とする、当該材料の成分組成の改変。

【請求項 10】酵素組成物が請求項 1 乃至請求項 3 記載の酵素組成物である請求項 9 記載の改変。

【請求項 11】酵素組成物が請求項 4 乃至請求項 8 記載の製造で得ることができる酵素組成物である請求項 9 又は請求項 10 記載の改変。

【請求項 12】二糖配糖体が香気成分前駆体又は色素成分前駆体である請求項 9 乃至請求項 11 記載の改変。

【請求項 13】香気成分前駆体又は色素成分前駆体が植物由来である請求項 12 記載の改変。

【請求項 14】二糖配糖体が  $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体である請求項 9 乃至請求項 13 記載の改変。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、二糖配糖体である  $\beta$ -プリメベロシド及び／又はその類似体を二糖単位で切断する作用を有する新規な酵素活性を含有する酵素組成物及び微生物より当該酵素組成物を得る方法、並びに当該酵素組成物を用いた用途に関する。より詳細には、微生物より得ることができ、各種成分の前駆体である  $\beta$ -プリメベロシド及び／又はその類似体に作用して、各種成分を生成させる能力を有する酵素を有効成分として含有する酵素組成物及びその製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

例えば、植物の香気成分であるゲラニオール、リナロール、ベンジルアルコール、2-フェニルエーテルや  $C_{13}$ -ノルテルペノイドアルコールなどのアルコール系香気は花、茶、果物、ワインなどの香気生成に重要な働きをなしている。

【0003】

これらの香気成分のなかで、ベンジルアルコールや (Z)-3-ヘキセノールの香気前駆体としては  $\beta$ -D-glucopyranoside 等の単糖配糖体が単離同定されている。

【0004】

最近になって、花のような香気について重要な働きを果たすと考えられる、ゲラニオールやリナロール等のアルコール系香気前駆体として二糖配糖体の  $\beta$ -primeveroside ( $6-O-\beta$ -D-xylopyranosyl- $\beta$ -D-glucopyranoside) あるいはその類似体の存在が確認された。また、その他の前述した他のアルコール

系香気成分の前駆体としても二糖配糖体の $\beta$ -primeverosideとその類似体の存在が明らかになってきている。

#### 【0005】

さらに香気以外にも色素、薬理成分など生理活性物質の一部においても二糖配糖体 $\beta$ -primeverosideあるいはその類似体として存在していることが明らかになってきている。例えばソテツなどにマクロザミンは $\beta$ -プリメベロシダーゼによって二糖単位で切断され毒素が生成することが知られている。

#### 【0006】

##### 【発明が解決しようとする課題】

上述のように、生理活性成分の前駆体に作用して $\beta$ -プリメベロシドを二糖単位で切断する作用を有する酵素は茶葉などよりわずかに確認、精製されているのみであり、その利用に関してはほとんど研究されていない状況である。従って、従来の茶葉などの給源に頼ることなく、工業的に大量に、更に安価に生産する方法の開発が強く望まれていた。

#### 【0007】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記問題点を解決すべく鋭意研究の結果、発酵培養法による生産法で微生物にその給源を求めた。即ち、上述のような作用を有する酵素を生産する微生物を広く自然界に求めスクリーニングを重ねた結果、工業的レベルで $\beta$ -プリメベロシドを二糖単位で切断する作用を有する酵素生産能を有する発酵培養法に適した微生物を見い出すことができ、本発明を完成した。

#### 【0008】

本発明者等は当該微生物を培養することにより得られた酵素組成物を用いることによって、生理活性成分の前駆体に作用させた場合には生理活性成分を生成することを確認した。尚、本発明において各種酵素活性測定は特に記載しないかぎり、以下に記載する方法により行った値で表示する。

#### 【0009】

##### ① プリメベロシダーゼ活性

活性の測定は自動化学分析装置（東芝社製、TBA-30R）を用いて行った。

酵素サンプル30 $\mu$ lと基質としてパラニトロフェニル (pNP) プリメベロシドを2mMに酢酸緩衝液 (pH5.5)に溶解せしめたもの200 $\mu$ lと混合し、40℃、サイクルタイム22.5secで反応させた後、炭酸ナトリウム250 $\mu$ lを加え412nmの吸光度を測定した。サンプル由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに20mM酢酸緩衝液 (pH5.5)を用いて同様に測定した。

この条件下で吸光度を1上昇させる酵素量を1単位とした。

基質となるpNP-プリメベロシドは、例えばpNP-グルコシド (メルク社製) とキシロオリゴ糖 (和光純薬社製) を酵素キシロシダーゼ (シグマ社製) を用いて反応させ、pNP-グルコシドにキシロースを $\beta$ -1,6結合で1残基転移させることにより合成できる。

#### 【0010】

##### ② $\beta$ -グルコシダーゼ活性

活性の測定は自動化学分析装置 (東芝社製、TBA-30R) を用いて行った。

酵素サンプル10 $\mu$ lと基質としてパラニトロフェニル (pNP) グルコシド (メルク社製) を2mMに酢酸緩衝液 (pH5.5)に溶解せしめたもの200 $\mu$ lと混合し、40℃、サイクルタイム22.5secで反応させた後、炭酸ナトリウム250 $\mu$ lを加え412nmの吸光度を測定した。サンプル由来のブランクの測定は基質溶液の代わりに20mM酢酸緩衝液 (pH5.5)を用いて同様に測定した。

この条件下で吸光度を1上昇させる酵素量を1単位とした。

#### 【0011】

次いで本発明について詳細に説明する。本発明者らは、 $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体を二糖単位で切断する作用を有する酵素 (以下、 $\beta$ -プリメベロシダーゼとも言う) 生産能を有する微生物を得るため、広く自然界に給源を求め土壌から分離した数種の菌株が当該作用を有する酵素を生産することを見いだした。類似する二糖配糖体とは、アグリコン側にグルコースを有する二糖類であり、例えば、アピオフラノシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド、アラビノフラノシル- $\beta$ -D-グルコピラノシド等が挙げられる。

#### 【0012】

本発明の $\beta$ -プリメベロシダーゼを生産する微生物は、例えば以下のようにし

てスクリーニングすることができる。即ち、土壌の懸濁液を、オイゲニルプリメベロシド等を唯一の炭素源として含有する分離用液体培地に接種することにより集積培養を行い、その培養液を同様の分離用平板寒天培地に塗布して、生育したコロニーを選択して拾う。これらの菌株を適当な液体培地で培養して、pNP-プリメベロシド等から二糖をバイパスし、pNP遊離活性を有する菌株を選択することができる。

#### 【0013】

このようにして選択された菌株について、更にpNP-プリメベロシド等を基質としてプリメベロース遊離を指標として $\beta$ -プリメベロシダーゼ産生微生物をスクリーニングすることができる。

#### 【0014】

本発明者らが分離した主な菌株（菌株A～菌株Dの4種）について、その菌学的性質を、下記の①～③の文献を参考にして同定した。

#### 【0015】

文献：①Raper, K. B. and Fennell, D. I. 1965. "The genus *Aspergillus*", Williams & Wilkins, Baltimore.

#### 【0016】

②Kozakiewicz, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. Mycological Papers, No.161, CAB International Mycological Institute.

#### 【0017】

③Al-Musallam, A. 1980. "Revision of the black *Aspergillus* species", University of Utrecht,

以下、菌学的性質を記載する。

#### 【0018】

#### 菌株Aの同定

##### 生育状態

##### ① 生育状態

・ツアペック寒天培地

コロニーの大きさは直径48～50mm (25℃, 7日), 表面はビロー



ド状～粉状，菌糸は白色，分生子の形成はやや悪い，暗緑色(dull green)～灰緑色(grayish green)，裏面は薄黄茶(light yellowish brown)～茶色(brown)。

・麦芽エキス寒天培地

コロニーの大きさは直径78～80mm (25℃，7日)，表面はビロード状～粉状，菌糸は白色，分生子の形成は非常に良好，暗緑色(dull green)～灰緑色(grayish green)，裏面は無色～黄白色(yellowish white)。37℃ (3日)でのコロニーの大きさは直径73～75mm。45℃でもよく生育する。

【0019】

② 形態

- ・分生子頭：密な円筒状，長さ48～128 $\mu$ ，直径16～52 $\mu$ ，暗緑色(dull green)～灰緑色(grayish green)。
- ・分生子柄：基生菌糸より生じる，長さ125～800 $\mu$ （多くは500 $\mu$ 以下），直径5～10 $\mu$ ，まっすぐ～わずかに湾曲する，滑面。
- ・頂のう： 直径10～25 $\mu$ ，フラスコ形，上部2/3にフィアライドを形成する。
- ・メトレ： 形成しない。
- ・フィアライド：5.6～12 $\times$ 2.4～3.2 $\mu$
- ・分生子： 直径2.6～3.6 $\mu$ ，球形～亜球形，粗面。
- ・子のう胞子： 形成しない。

【0020】

以上の結果より菌株Aは、分生子形成細胞が単列（メトレを形成しない）、分生子頭が円筒状で暗緑色～灰緑色，分生子が球形，子のう胞子を形成しないことから，*Aspergillus fumigatus* group に属する。更に、分生子頭が密な円筒状で、しかもうなずくような形(nodding appearance)にならない、分生子が粗面、多くの分生子柄が500 $\mu$ 以下であることから、アスペルギルス・フミガタス (*Aspergillus fumigatus*) である。

【0021】

菌株B、菌株C及び菌株Dの同定

① 生育状態

【0022】

【表1】

培地	項目	菌株B	菌株C	菌株D
ツアベック寒天培地	コロニーの直径 (25℃, 7日)	45~48mm	47~50mm	46~48mm
	コロニーの直径 (25℃, 14日)	80mm以上	80mm以上	80mm以上
	菌糸層	密, 白~黄色	密, 白色	密, 白色
	分生子の形成	良好	良好	良好
	分生子の色	暗灰褐色から 黒褐色	暗灰褐色から 黒褐色	暗灰褐色から 黒褐色
	裏面の色	白~黄色	白色	白色
麦芽エキス寒天培地	コロニーの直径 (25℃)	46~51mm	53~55mm	55~59mm
	菌糸層	薄く平坦, 無 色	薄く平坦, 無 色	薄く平坦, 無 色
	分生子の形成	非常に良好	非常に良好	非常に良好
	分生子の色	黒~黒褐色	黒~黒褐色	黒~黒褐色
	裏面の色	無色	無色	無色

【0023】

② 形態 (ツアベック寒天培地)

【0024】

【表 2】

項 目		菌株 B	菌株 C	菌株 D
分生子頭	形	球形, 放射状, 成熟すると円筒状に裂けるものがある	球形, 放射状, 成熟すると円筒状に裂けるものがある	球形, 放射状, 成熟すると円筒状に裂けるものがある
	大きさ	120~560 $\mu$ m	150~500 $\mu$ m	125~350 $\mu$ m
	色	暗灰褐色から黒褐色	暗灰褐色から黒褐色	暗灰褐色から黒褐色
分生子柄	起源	基生菌糸から生じる	基生菌糸から生じる	基生菌糸から生じる
	長さ	350 $\mu$ ~3mm	350 $\mu$ ~3mm	350 $\mu$ ~2.5mm
	直径	9~20 $\mu$	10~22.5 $\mu$	12.5~20 $\mu$
	表面	滑面	滑面	滑面
頂のう	直径	20~80 $\mu$	15 (多くは35) ~ 80 $\mu$	30~80 $\mu$
	形 メトレ の形成 部位	球形 全面	球形 全面	球形 全面
メトレ	長さ	20~24 $\mu$	12~22.4 $\mu$	12.8~24 $\mu$
	直径	5.6~7.2 $\mu$	4.8~6.8 $\mu$	5.6~8 $\mu$
	形	球形~亜球形	球形~亜球形	球形~亜球形
	表面	粗面	粗面	粗面
子のう胞子		形成しない	形成しない	形成しない

## 【0025】

以上の結果より菌株 B、菌株 C 及び菌株 D は共に分生子形成細胞が複列（メトレとフィアライドを形成する）、分生子頭が球形で黒色系であることなどから、*Aspergillus niger* group に属する。更に、ツアベック寒天培地でコロニーの直径が14日で5cm以上になる、分生子の表面が粗面(verrucose)である、分生子が6 $\mu$ 以下で球形~亜球形、暗灰褐色~黒褐色である、分生子柄が6 $\mu$ 以下であることなどから、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) var. *niger* である。

## 【0026】

更に本発明者らは、タイプカルチャーよりアスペルギルス属に属する菌株をラ

ンダムに選択してその菌株による $\beta$ -プリメベロシダーゼの生産能を確認した。その結果、*Aspergillus niger* IF04407、*Aspergillus niger* IAM2020、*Aspergillus fumigatus* IAM2046等にもその生産能が確認された。

#### 【0027】

本発明において利用できる菌種は、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ生産能を有する菌種であれば何れも使用することができ、上述した菌種に限定されない。更に、本発明において利用できる生産方法としては、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ生産能を有する菌種の突然変異株、あるいは組換えDNA法により $\beta$ -プリメベロシダーゼを生産できるように改変された各種微生物、或いは各種細胞、例えば酵母細胞、細菌細胞、高等植物細胞、動物細胞等をも包含する。 $\beta$ -プリメベロシダーゼ遺伝子を導入することで、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ生産能を付与する場合にはホストとなる微生物には $\beta$ -プリメベロシダーゼ生産能がなくてもよい。

#### 【0028】

上述した各種微生物などを用いて $\beta$ -プリメベロシダーゼを製造するためには、当該微生物の培養に適合した方法や条件を設定でき、これらの方法や条件は特に限定されない。例えば、上述した各種菌種の培養法としては液体培養、固体培養の何れでも良いが、好ましくは液体培養が利用される。液体培養としては例えば、以下のようにして行うことができる。

#### 【0029】

使用できる培地としては、 $\beta$ -プリメベロシダーゼを生産する微生物が生育可能な培地であれば、如何なるものでも良い。例えば、グルコース、シュクロース、ゲンチビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、更に硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、或いは、ペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、更にカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩を添加したものを用いることができる。更に、 $\beta$ -プリメベロシダーゼを生産蓄積せしめるために培地に各種の誘導物質を添加することができる。誘導物質としては例えば糖類が使用でき、好ましくはゲントース、ゲンチビオース、ゲンチオリゴ糖

等が利用できる。これらの誘導物質の添加量は目的とする $\beta$ -プリメベロシダーゼの生産能が増大される量であれば特に限定されないが、好ましくは0.01~5%が添加される。

#### 【0030】

培地のpHは例えば約3~8、好ましくは約5~6程度に調製し、培養温度は通常約10~50℃、好ましくは約30℃程度で、1~15日間、好ましくは4~7日間程度好氣的条件下で培養する。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーマンターによる好氣的深部培養法が利用できる。しかしながら、上述した各種の培養条件などは当然のことながら、培養する対象である微生物や細胞により適宜変更され、本発明の $\beta$ -プリメベロシダーゼが生産される条件であれば、その条件等は限定されない。

#### 【0031】

得られた培養液から $\beta$ -プリメベロシダーゼを単離精製するには、遠心分離、UF濃縮、塩析、イオン交換樹脂等の各種クロマトグラフィーを組み合わせ、常法により処理して、精製したプリメベロシダーゼを得ることができる。

#### 【0032】

本発明の酵素組成物は上述の微生物を培養した培養液そのままで利用できる。もちろん本培養液は本発明の使用目的に応じてその精製度合いを適宜変更することができる。

#### 【0033】

次いで、本発明の酵素組成物を用いた各種の用途について述べる。 $\beta$ -プリメベロシダーゼは、各種成分、例えば植物材料の香気、色、生理活性含有量等を増強したり、これらの成分の抽出効率を調節することに使用できる。従って、より香気の高い食物、飲料やより香りの高いスパイスや香料、香水などの製造に利用でき、更に前述の製造時における処理において適宜利用することにより、好ましくない香りの早期放出にも使用できる。また、色に関しては植物材料、食物、飲料の色合い改善、発色、あるいは色素の製造に利用できる。

#### 【0034】

更には、香気成分と同様に、品質上好ましくない色素前駆体の分解除去にも使

用でき、生理活性に関しては生薬、ハーブ、その他植物性成分の薬理成分や有用生理活性成分の増強やあるいは好ましくない成分の分解除去に使用できる。

#### 【0035】

即ち、各種のプリメベロシドとその類似体である二糖配糖体成分に本発明の $\beta$ -プリメベロシダーゼを作用させることによって前述の作用をもたらすことが可能である。

#### 【0036】

本発明の対象とするプリメベロシド及び／又はその類似体を含有する物としては、 $\beta$ -プリメベロシダーゼの作用を受けるものであればいかなるものであってもよく、例えば、食品、化粧品、医薬品、医薬部外品、農薬、飼料等であり、より具体的には各種香気を有する食品、トイレタリー製品、木工製品や畳などの植物性材料から作られる工業製品などの製造にも利用できる。

#### 【0037】

本発明の $\beta$ -プリメベロシダーゼが好ましく利用される対象としては、香気成分を有する食品が挙げられる。具体的に述べるとウーロン茶、ジャスミン茶等の製造において、例えば「萎調」の工程で使用したり、紅茶（CTC法によるティーパック用紅茶など）の香気増強、ワインの香気増強に利用できる。また、化粧品の香気保持や香水の香気保持、医薬品における香気の改善や薬理効果の改善にも利用できる。

#### 【0038】

更に、色素の製造においても有用である。例えば、西洋茜からのルベリトリン酸からの染料アリザリンの抽出に用いることによって、従来よりも効率よく色素の抽出を行うことができる。

#### 【0039】

また、 $\beta$ -プリメベロシダーゼを利用して香気、色素、生理活性成分とプリメベロースに作用させてその前駆体を製造することも可能である。これら成分は配糖化することにより安定性、保存性の改善や無毒化、薬理成分のDDS化も期待できる。

#### 【0040】

$\beta$ -プリメベロシダーゼの利用方法としては、その対象とするものの形態によりその添加方法、添加量、反応方法などを適宜変更することができる。

#### 【0041】

具体的な利用方法としては、香気前駆体を含有する植物抽出物あるいは醗酵産物に本発明の $\beta$ -プリメベロシダーゼを加えてインキュベートする。その条件は、本発明の $\beta$ -プリメベロシダーゼが香気、色素、生理活性成分前駆体に作用し香気、色素、生理活性成分を遊離できる条件であれば特に限定されないが、その条件については当業者が多大な労力を費やすことなく設定できる。この条件の基で、当該成分濃度を上昇させることができる。

#### 【0042】

また、本発明の酵素を植物中に存在する香気、色素、生理活性成分濃度の上昇にも利用できる。即ち、植物はこれら成分の前駆体を有しているため、植物に有効量の本発明の $\beta$ -プリメベロシダーゼを与え、当該植物中の前駆体が加水分解できる条件下で栽培することにより植物の香気、色素、生理活性成分を上昇させることができる。また、本発明の酵素組成物を利用することにより、対象となる植物中の香気、色素、生理活性成分等の生成時期を調節することができる。

#### 【0043】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はその要旨を越えない限り、以下の実施例に限定されるものではないことはいうまでもない。

#### 【0044】

#### 【実施例】

##### 実施例 1

アスペルギルス・ニガー IF04407ならびにアスペルギルス・ニガー IAM2020を前培養培地（組成；0.2%酵母エキス、0.5%ペプトン、2%グルコース、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、pH5.7）にて30℃ 一晚振とう培養後、培養液を本培養培地（4%大豆粉、0.3%食塩、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、2%可溶性デンプン、1%赤ふすま、pH5.6）に1/100量接種し6日間振とう培養し、培養液から菌体を除去して粗酵素液を得た。この酵素液について、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ活性及び $\beta$ -グルコシダーゼ活性を測定した。

## 【0045】

その結果、IF04407株で $\beta$ -プリメベロシダーゼ活性は0.129単位/mlであり、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性は4.34単位/ml、またIAM2020株で $\beta$ -プリメベロシダーゼ活性は0.156単位/mlであり、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性は5.97単位/mlであった。

## 【0046】

実施例 2

実施例 1 に従って、アスペルギルス・フミガタス IAM2046株を同様に前培養し、培養液を本培養培地（2%大豆粉、0.3%食塩、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3%可溶性デンプン、0.5%ゲントース（日食社製）、pH5.6）に4日間培養し、粗酵素液を得た。その結果、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ活性は0.106単位/mlであり、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性は0.320単位/mlであった。

## 【0047】

実施例 3

アスペルギルス・フミガタスIAM2046株を用いて $\beta$ -プリメベロシダーゼ生産における誘導物質の影響について検討した。アスペルギルス・フミガタスIAM2046株を培地（2%大豆粉、0.3%食塩、0.1% $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3%可溶性デンプン）に各種糖を0.1%加え6日間培養し、 $\beta$ -プリメベロシダーゼ活性を測定した。その結果を表3に示す。

## 【0048】



【表 3】

誘導物質	誘導能 (%)
無添加	100
イソマルトース	145
マルトトリオース	171
マルトース	136
ゲントース	235
ゲンチビオース	211
ゲンチオリゴ糖	180
スクロース	116
トレハロース	113
グルコース	164
ガラクトース	125
フルクトース	143
ラムノース	129
ツルボース	116
マルチトール	142
アラビトール	112
ガラクトチトール	142
エンサングルコサミン	157

## 【0049】

表より明らかなように、各種糖により $\beta$ -プリメベロシダーゼの生産能が増大した。特にゲントース、ゲンチビオース、ゲンチオリゴ糖に特に高い誘導能が見られた。

## 【0050】

更に、アスペルギルス・ニガー IF04407及びアスペルギルス・ニガー IAM2020においても同様の効果が見られた。

## 【0051】

実施例 4

実施例 1、2 で得られた粗酵素液を分子量6,000カットの限外ろ過膜で濃縮した。次いで、この濃縮液 1 ml と 20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.0) で 5 mg/ml に調製された pNP-プリメベロシド溶液 1 ml とを混合し、37℃ でインキュベートした。1, 2, 4, 24, 48 時間後のサンプルをそれぞれ回収し、薄層クロマトグラフ (TLC) にて

プリメベロースの遊離を確認した。

【0052】

その結果TLCで実施例1記載のアスペルギルス・ニガー2株及び実施例2記載のアスペルギルス・フミガタスの培養液のいずれにおいてもプリメベロースと同じ位置にスポットを観察できた。粗酵素濃縮液を熱処理（100℃、10分）し、同様の実験を行ったサンプルではこのようなスポットは観察されなかった。したがって、粗酵素濃縮液中にpNP-プリメベロシドからプリメベロースを遊離する酵素の存在が確認された。

【0053】

実施例5

香り成分前駆体であるオイゲニルプリメベロシドの調整法

山茶花の新葉約2kgを100℃、10分で熱水抽出し、抽出液をダイアイオンHP20（三菱化学社製）をつめたカラムに掛け、オイゲニルプリメベシドを吸着させた。カラムをベッドボリュームの約2倍の脱イオン水、20%メタノールで洗浄した後、100%メタノールで吸着したオイゲニルプリメベロシドを回収した。回収されたオイゲニルプリメベロシドを含むメタノール溶液をその後濃縮し、オイゲニルプリメベロシドを結晶化させ、ガラスフィルターにて回収した。

【0054】

実施例4で得られた粗酵素濃縮液1mlと20mMリン酸緩衝液（pH6.0）で5mg/mlに調製されたオイゲニルプリメベロシド溶液1mlとを混合し、37℃で24時間でインキュベートし、香りの生成を官能試験（パネラー10名）により調べた。その結果、アスペルギルス・ニガー2株及びアスペルギルス・フミガタスの両粗酵素濃縮液を用いた場合の全てにおいてオイゲノール特有の香り生成することが確認された。

【0055】

粗酵素濃縮液を熱処理（100℃、10分）したものをを用いた場合においては、オイゲノール特有の香りは感じられなかった。したがって、これら粗酵素抽出液にはオイゲニルプリメベロシド等の配糖体から香り成分であるアグリコンを遊離する作用がある事が判った。

【0056】

実施例 6

実施例 4 で得られた各種粗酵素濃縮液 1 ml とブドウ果汁（市販品：果汁 100%、濃縮還元）1 ml とを混合し 37℃ にて一晚（14 時間）インキュベートし、香りを調べたところ、酵素剤の代わりに酢酸緩衝液を加えたものに比べ明らかに香りが増強された。またこの作用は粗酵素濃縮液を 100℃ で 10 分間加熱処理したものでは見いだせなかった。

【0057】

実施例 7

実施例 4 で得られた粗酵素濃縮液 1 ml と市販オレンジ果汁（還元濃縮液）1 ml とを混合し 37℃ で 24 時間でインキュベートし、香りの生成を官能試験により調べた。その結果、アスペルギルス・ニガー 2 株及びアスペルギルス・フミガタス両粗酵素濃縮液でオレンジ果汁の香りの増強効果が認められた。粗酵素濃縮液を熱処理（100℃、10 分）したものではこのような効果は認められなかった。

【0058】

【発明の効果】

本発明により、新規な酵素である、 $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体を二糖単位で切断する作用を有する酵素を微生物を給源として供給することができ、本発明の酵素組成物を用いることによって、各種食品、医薬品、医薬部外品などに広く使用できる。例えば食品などにおいてその香気、色素、生理活性成分を増強あるいは減弱することができる。

【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 新規な酵素組成物及びその用途を提供する。

【構成】 微生物より得ることができ、二糖配糖体である $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体を二糖単位で切断する作用を有する新規な酵素を含む酵素組成物であり、各種成分の前駆体である $\beta$ -プリメベロシド及び／又は類似する二糖配糖体に作用して、各種成分を生成する。

【選択図】 なし

【書類名】

職権訂正データ

【訂正書類】

特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

申請人

【識別番号】

000216162

【住所又は居所】

愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号

【氏名又は名称】

天野製薬株式会社

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000216162]

1. 変更年月日	1990年 8月10日
[変更理由]	新規登録
住 所	愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号
氏 名	天野製薬株式会社